sebia

HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING

Ref. 4353

HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING

Ref. 4355

IVD

CE

2008/09

UTILIZACIÓN

Los kits HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING e HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING permiten la detección cualitativa, la identificación y la confirmación de las inmunoglobulinas oligoclonales puestas en evidencia en los perfiles electroforéticos del líquido cefalorraquídeo humano (LCR ó CSF: cerebrospinal fluid). La técnica usada es el isoelectroenfoque en gel de agarosa en el sistema semiautomático HYDRASYS, completado con una inmunofijación en la que se usa un antisuero anti-Ig G acoplado a peroxidasa. La utilización de este antisuero permite aumentar la sensibilidad de detección de las bandas oligoclonales de Ig G del LCR sin concentración previa.
El objetivo es poner en evidencia un perfil oligoclonal específico de las inmunoglobulinas G del LCR, debido a síntesis intratecal, comparando después de la inmunofijación los perfiles del suero y del LCR del mismo paciente.

Los kits HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING e HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING están recomendados cuando se sospecha la existencia de algunas enfermedades del sistema nervioso central (SNC), como la esclerosis múltiple. La detección de bandas oligoclonales y de un proceso inflamatorio (síntesis intratecal de inmunoglobulinas) es una gran ayuda para el diagnóstico.

Para uso en Diagnóstico *In Vitro.*

PRINCIPIO DEL TEST

Muchas dolencias del sistema nervioso central están asociadas con aumento de la concentración proteica del LCR debida, o bien a un aumento en la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica, o bien a la síntesis de inmunoglobulinas, principalmente Ig G, dentro del sistema nervioso central. En este último caso, esa síntesis intratecal de inmunoglobulinas está a menudo asociada a una restricción de la heterogeneidad, que se manifiesta por un reparto oligoclonal detectado en la zona gamma de las migraciones electroforéticas de alta resolución. En la zona de gammaglobulinas pueden detectarse también bandas que no son inmunoglobulinas (Ig), pero no tienen la misma importancia diagnóstica. La inmunofijación es la técnica elegida, ya que puede confirmar que las bandas oligoclonales corresponden a Ig y puede identificar la Ig implicada, además de proveer la especificidad diagnóstica que requiere el análisis.
El reparto oligoclonal de las Ig G tiene importancia diagnóstica en la rutina, y la prueba de SEBIA está recomendada especialmente para la detección de esas bandas oligoclonales de Ig G usando un anticuerpo específico anti-Ig G.
La presencia de Ig G intratecales sugiere la existencia de una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central, causada por ejemplo por una esclerosis múltiple. Aunque el perfil oligoclonal no es exclusivo de esta enfermedad, su presencia se usa como información complementaria importante para el diagnóstico, y su detección es considerada como una prueba esencial en el consenso, definido en 1994 por el "Comité de la Acción Europea Concertada para la Esclerosis Múltiple". Es una prueba de confirmación en los pacientes que presentan episodios clínicos de esclerosis múltiple, y una prueba indicativa en los pacientes que hayan sufrido pocos episodios de esclerosis o con síntomas clínicos no concluyentes.

Los criterios de selección propuestos por el Comité para la detección de las bandas oligoclonales de Ig G en el LCR son los siguientes:
1. La técnica más sensible y resolutiva para la detección de las Ig G oligoclonales es el isoelectroenfoque,
2. Las Ig G oligoclonales deben ser detectadas usando un antisuero específico,
3. Para confirmar la síntesis intratecal de las Ig G, hay que analizar en paralelo el suero y el LCR del mismo paciente para distinguir las diferencias en el perfil de distribución de las Ig G,
4. Para facilitar la interpretación, las concentraciones de Ig G del suero y del LCR deben ser idénticas.
5. Hay que evitar concentrar el LCR si es posible.

La técnica HYDRAGEL 3 y 9 CSF ISOFOCUSING responde perfectamente a todos estos criterios.

El análisis se realiza en dos etapas:
- isoelectroenfoque en gel de agarosa para separar las proteínas del LCR y el suero.
- Inmunofijación con un antisuero anti-Ig G marcado con peroxidasa para detectar las bandas oligoclonales de Ig G y para mostrar la diferencia o la similitud de distribución de las Ig G en el LCR y el suero.

Una inmunofijación estándar que emplea anticuerpos no marcados necesita que la concentración de las Ig G esté alrededor de 500 mg/L, mientras que las concentraciones de las Ig G del LCR están generalmente comprendidas entre 10 y 50 mg/L. Es necesario entonces obtener un volumen total de LCR entre 2 y 5 mL para obtener una concentración suficiente.
Comparada con la inmunofijación estándar, la sensibilidad de detección de la técnica HYDRAGEL 3 & 9 CSF ISOFOCUSING está aumentada unas 100 veces mediante el uso de anticuerpos marcados con un enzima. Así, con una concentración de Ig G superior o igual a solamente 10 mg/L, las Ig G y su distribución pueden ser detectadas y comparadas sin concentrar la muestra de LCR.

El sistema semiautomático HYDRASYS realiza todas las etapas necesarias para obtener geles listos para ser interpretados.
Cada gel de agarosa incluido en el kit HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING contiene 6 carriles y permite por tanto realizar el análisis comparado de las Ig G de 3 parejas LCR-suero.
Cada gel de agarosa incluido en el kit HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING contiene 18 carriles y permite por tanto realizar el análisis comparado de las Ig G de 9 parejas LCR-suero.
Esta técnica sencilla y rápida proporciona una imagen clara y fácilmente interpretable.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS EN LOS KIT HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING E HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING

COMPONENTES	REF N° 4353	REF N° 4355
Geles de agarosa (listos para usar)	10 geles	10 geles
Solución de etilén-glicol (lista para usar)	1 vial de 3 mL	1 vial de 3 mL
Solución anódica (lista para usar)	1 vial de 50 mL	1 vial de 50 mL
Solución catódica (lista para usar)	1 vial de 50 mL	1 vial de 50 mL
Esponjas (a impregnar)	10 bolsas de 2	10 bolsas de 2
Diluyente de muestra CSF (listo para usar)	1 vial de 85 mL	1 vial de 85 mL
Diluyente de antisuero CSF ISOFOCUSING (listo para usar)	1 vial de 3.75 mL	1 vial de 3.75 mL
Solución rehidratante CSF (lista para usar)	2 viales de 70 mL	2 viales de 70 mL
Solvente TTF3 (listo para usar)	2 viales de 20 mL	2 viales de 20 mL
TTF3 (solución concentrada)	2 viales de 0.5 mL	2 viales de 0.5 mL
Aplicadores (listos para usar)	1 caja de 10 (6 dientes)	1 caja de 10 (18 dientes)
Contenedores de tampón (listos para usar)	1 bolsa de 2	1 bolsa de 2
Segmentos para antisueros (listos para usar)	1 caja de 10	1 caja de 10
Papeles de filtro - Finos	1 paquete de 10	1 paquete de 10
Papeles de filtro - Gruesos	3 paquetes de 10	3 paquetes de 10
Láminas de plástico	1 paquete de 10	1 paquete de 10

PARA OBTENER RESULTADOS ÓPTIMOS :

Los reactivos de un mismo kit deben ser usados conjuntamente y según las instrucciones suministradas.

LEA DETENIDAMENTE LA HOJA DE INSTRUCCIONES.

1. GELES DE AGAROSA

Preparación

Los geles de agarosa están listos para su uso. Cada gel contiene: agarosa, 10 g/L ; anfolitos ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso

Medio de soporte para el isoelectroenfoque e inmunofijación de las proteínas.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Conserve los geles horizontalmente en el estuche protector y en nevera (2 a 8 °C). Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit y en la etiquetas de sus recipientes protectores. (La flecha de la parte frontal del kit debe apuntar hacia arriba).
No almacene los geles cerca de una ventana o de una fuente de calor. Evite variaciones de temperatura importantes.
NO LOS CONGELE.
Deséchelos cuando:

(i) haya cristales o precipitados en la superficie del gel o su textura sea muy blanda (consecuencias de la congelación del gel),
(ii) se observe crecimiento bacteriano o fúngico,
(iii) haya una cantidad anormal del líquido en el estuche del gel (como resultado de la exudación del tampón debido a condiciones de conservación inadecuadas).

2. SOLUCIÓN DE ETILÉN-GLICOL

Preparación

La solución de etilén-glicol está lista para usar.

ATENCIÓN: ¡Nociva en caso de ingestión!

Uso

Sirve para garantizar el contacto entre el gel y la placa de migración durante la migración electroforética.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución de etilén-glicol puede conservarse a temperatura ambiente o en nevera. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial.

3. SOLUCIONES ANÓDICA Y CATÓDICA

Preparación

La solución anódica (solución ácida) y la solución catódica (solución básica) están listas para su uso. Ambas contienen componentes, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

NOTA: Para una fácil identificación y como ayuda para controlar su aplicación, la solución anódica es de color rojo para identificar la esponja anódica.

ATENCIÓN: La solución catódica contiene hidróxido de sodio. Irrita la piel y los ojos. Si contacta con los ojos, lávelos inmediatamente con agua en abundancia y consulte a un médico.

Uso

Para tamponar las esponjas anódica y catódica para realizar el isoelectroenfoque.

IMPORTANTE: Después de cada uso, cierre el vial de solución catódica inmediatamente para evitar que la solución se carbonate.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones anódica y catódica pueden conservarse a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) o en nevera (entre 2 y 8 °C). Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas de los viales. Las soluciones deben estar exentas de precipitados.

4. ESPONJAS (PARA TAMPONAR)

Preparación

Sature las dos esponjas con las soluciones anódica y catódica respectivamente 5 minutos antes de usarlas:
Coloque en una superficie plana el contenedor gris para la esponja anódica y el contenedor azul para la esponja catódica.
Dispense 5 mL de la solución anódica roja en el contenedor gris y 5 mL de solución catódica incolora en el contenedor azul.
Abra la bolsa de las esponjas no tamponadas, coja las esponjas por los extremos de plástico y coloque una en cada contenedor.
Empápelas uniformemente presionando varias veces con la punta de pipeta correspondiente.
Use las esponjas saturadas sin demora.

IMPORTANTE: Sature las esponjas justo antes de usarlas para evitar que la solución catódica se carbonate.

NOTA : Si la esponja está seca (dura), antes de impregnarla con la solución correspondiente se aconseja sumerjirla en agua caliente (a unos 60 °C), escurrirla bien, lavarla con agua destilada o desionizada, y escurrirla de nuevo. Esta operación facilitará la impregnación de la esponja con las soluciones anódica o catódica.

ATENCIÓN : Se recomienda tomar las precauciones necesarias al manipular agua caliente (a una temperatura ≥ a 40 °C).

Uso

Las esponjas, empapadas respectivamente con las soluciones anódica y catódica, aseguran el contacto entre el gel y los electrodos y determinan el intervalo de pH durante el enfoque.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las esponjas húmedas pero no impregnadas pueden conservarse a temperatura ambiente o en nevera. Deben conservarse horizontalmente en sus bolsas protectoras (la flecha de la parte frontal del kit debe apuntar hacia arriba). Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas de la bolsa de las esponjas.
NO LAS CONGELE.

5. DILUYENTE DE MUESTRA CSF

Preparación

El diluyente de muestra está listo para su uso. Contiene solución salina suplementada con albúmina sérica bovina, azida sódica y aditivos inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso

Para las diluciones de las muestras de LCR y suero.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Conserve el diluyente de muestra en nevera (2 a 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en la etiqueta del vial. El diluyente debe estar exento de precipitados.

6. DILUYENTE DE ANTISUERO CSF ISOFOCUSING

Preparación

El diluyente de antisuero está listo para su uso. Contiene aditivos inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso

Para diluir el antisuero marcado con peroxidasa antes de usarlo.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

El diluyente de antisuero puede conservarse a temperatura ambiente o en nevera. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en la etiqueta del vial. El diluyente de antisuero debe estar exento de precipitados.

NOTA: Durante el almacenamiento, el diluyente de antisuero puede volverse amarillo sin ningún efecto adverso en su funcionamiento.

7. SOLUCIÓN REHIDRATANTE

Preparación

La solución rehidratante está lista para su uso. Contiene componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso

Para rehidratar el gel de agarosa antes de la etapa de visualización con peroxidasa.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución rehidratante puede conservarse a temperatura ambiente o en nevera y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en la etiqueta del vial. La solución rehidratante debe estar exenta de precipitados.

8. SOLVENTE DE TTF3

Preparación

El solvente de TTF3 está listo para su uso. Contiene componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso

Para preparar la solución de visualización TTF3 como se describe en el párrafo nº 9.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

El solvente de TTF3 puede conservarse a temperatura ambiente o en nevera y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en la etiqueta del vial. El solvente de TTF3 debe estar exento de precipitados.

9. TTF3

Preparación

Prepare la solución de revelado de trabajo justo antes de usarla. Añada los reactivos en el orden siguiente: 4 mL de solvente de TTF3, 100 µL de TTF3 y 4 µL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 % (110 volúmenes).

ATENCIÓN: El TTF3 contiene dimetilformamida. ¡Perjudicial por inhalación! Si la ventilación es insuficiente, use un equipo de respiración adecuado. ¡No lo ingiera! ¡En caso de ingestión, consulte a un médico inmediatamente! Dañino en contacto con la piel. Lleve ropa protectora apropiada. Irrita los ojos. Si contacta con los ojos o la piel, lave inmediatamente la zona afectada con agua en abundancia y consulte a un médico. Evite exponerse al producto y obtenga formación especializada antes de usarlo. Puede causar cáncer. Si se encuentra mal, consulte a un medico inmediatamente (muestra la etiqueta siempre que sea posible).

Uso
Para el revelado de las inmunoglobulinas separadas mediante isoelectroenfoque.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro
Conserve el TTF3 a temperatura ambiente o en nevera. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en la etiqueta del vial. La solución de TTF3 debe estar exenta de precipitados.

10. APLICADORES

Uso
Aplicadores precortados, de un solo uso, para la aplicación de la muestra en el gel.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro
Conserve los aplicadores en un lugar seco a temperatura ambiente o en nevera.

11. CONTENEDORES DE TAMPÓN

Uso
Contenedores coloreados reutilizables para tamponar las esponjas anódica y catódica.
El contenedor gris es para la esponja anódica y el contenedor azul para la esponja catódica.
Después de cada uso, lave los dos contenedores con agua destilada o desionizada y séquelos.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro
Conserve los contenedores de tampón limpios en una superficie plana a temperatura ambiente.

12. SEGMENTOS PARA ANTISUEROS

Uso
Segmentos coloreados, de un solo uso, para la aplicación del antisuero sobre el gel para realizar la inmunofijación.
ATENCIÓN: Manipule con cuidado los segmentos con el antisuero ya cargado.

13. PAPELES DE FILTRO FINOS

Uso
Papeles de filtro finos precortados, de un solo uso, para absorber el exceso de humedad de la superficie del gel antes de la aplicación de las muestras.

Conservación
Conserve los papeles de filtro finos en un lugar seco a temperatura ambiente o en nevera.

14. PAPELES DE FILTRO GRUESOS

Uso
Papeles de filtro gruesos, de un solo uso, para absorber las proteínas no precipitadas del gel después de la inmunofijación y la rehidratación.

Conservación
Conserve los papeles de filtro gruesos en un lugar seco a temperatura ambiente o en nevera.

15. LÁMINAS DE PLÁSTICO

Uso
Láminas de plástico, de un solo uso, para proteger el gel durante la migración electroforética.

EQUIPAMENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema HYDRASYS SEBIA, referencia nº 1211 con la opción FOCUSING HYDRASYS, SEBIA, referencia nº 1235.

o

2. Sistema HYDRASYS FOCUSING SEBIA, referencia nº 1212.
3. Pipeteador, manual o automático, como el HYDRAPLUS SEBIA, referencia nº 1216 o HYDRAPLUS 2 SEBIA, referencia nº 1217, para la carga de los aplicadores o los segmentos para antisueros.
4. Cámara Húmeda, n° 1270, suministrada con el HYDRASYS.
5. Guía metálica de la plantilla SEBIA, suministrada con el HYDRASYS.
6. Plantilla dinámica, SEBIA, referencia nº 1255.
7. Kit Accesorios HYDRASYS CSF ISOFOCUSING SEBIA, referencia nº 1258, que contiene las plantillas de aplicación de reactivos R3 y ENZ 4 mL, el soporte del segmento de carril único y la guía de la plantilla dinámica equipada con el semireductor de superficie, específicos para la técnica HYDRAGEL CSF ISOFOCUSING.
8. Contenedores de reactivo suministrados con el sistema HYDRASYS.
9. Pipetas de 2 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL y 5 mL.

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. ANTISUERO ANTI-Ig G - PER

Preparación
El vial de antisuero (SEBIA, referencia n° 4743) contiene inmunoglobulinas totales de mamífero anti-Ig G humanas conjugadas a la peroxidasa. Un procedimiento de estabilización permite conservar el antisuero en forma liofilizada.
El reactivo tiene un color específico para evitar errores al usarlo. El color es el mismo que el de la etiqueta del vial.
Reconstituya el vial de antisuero liofilizado con exactamente 0,7 mL de agua destilada o desionizada. Deje reposar 5 minutos y agite suavemente (evite la formación de espuma).
Después, prepare la solución de trabajo del antisuero justo antes de usarla mezclando:
Para el HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING: 25 µL de antisuero anti-Ig G - PER reconstituido y 175 µL de diluyente de antisuero. Homogenice bien la mezcla.
Para el HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING: 40 µL de antisuero anti-Ig G - PER reconstituido y 300 µL de diluyente de antisuero. Homogenice bien la mezcla.

Uso
Para la inmunoprecipitación de las proteínas separadas mediante isoelectroenfoque.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro
Antes de reconstituirlo, el antisuero liofilizado debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C) protegido de la luz, siendo estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial de antisuero o en su caja.
El antisuero reconstituido debe conservarse a 2 - 8 °C protegido de la luz y usarse en el plazo de una semana para evitar que se contamine o desnaturalice.
Puede congelarse (en alícuotas) y conservarse un máximo de 6 meses a - 20 °C.
IMPORTANTE: Después de la conservación a 2 - 8 °C ó a - 20 °C, homogenice el antisuero reconstituido antes de preparar la solución de trabajo (antisuero diluido).
El antisuero descongelado debe conservarse a 2 - 8 °C y usarse ese mismo día. No congele y descongele el antisuero más de 2 veces.
Deseche el antisuero si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

NOTA: Los antisueros pueden proceder de diferentes especies de animales. No mezcle dos viales de antisuero diferentes, incluso si son de la misma especificidad, y cambie SIEMPRE la punta de la pipeta al cambiar de vial de antisuero.

Durante el transporte, el antisuero puede permanecer a temperatura ambiente (15 a 30 °C) durante 15 días sin ningún efecto adverso en su funcionamiento.

2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO: H_2O_2, 110 volúmenes (30 %)
El peróxido de hidrógeno debe conservarse protegido de la luz y en nevera (entre 2 y 8 ºC). Use una pipeta perfectamente limpia en cada pipeteo para evitar que se contamine.

3. SOLUCIÓN DECOLORANTE
Preparación
Cada vial de Solución Decolorante concentrada (SEBIA, referencia nº 4540: 10 viales de 100 mL cada uno) debe ser diluida 1/1000 con agua destilada o desionizada, y permite obtener 100 litros de solución decolorante. Es conveniente diluir sólo 5 mL de la solución concentrada en 5 litros de agua, que es el volumen del contenedor de solución decolorante. Después de la dilución, la solución decolorante diluida contiene: ácido cítrico, 0,5 g/L.

Uso
Para lavar el gel después del revelado enzimático y el secado.
Para limpiar la cubeta de coloración del HYDRASYS.
Para neutralizar la acidez del decolorante antes de desecharlo, dispense 15 mL de una solución de hidróxido de sodio al 50 % en el contenedor de desechos vacío.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro
El decolorante concentrado puede conservarse a temperatura ambiente o en nevera. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en la etiqueta del vial. El decolorante diluido es estable durante 1 semana a temperatura ambiente en un contenedor cerrado. No le añada azida sódica.
Deseche el decolorante diluido si cambia de aspecto o se vuelve turbio debido a contaminación microbiana.
En caso de conservación prolongada (más de una semana) de la solución diluida, añada 50 µL/L de ProClin 300 para evitar la proliferación microbiana.
El decolorante diluido al que se le ha añadido ProClin es estable en un contenedor cerrado a temperatura ambiente o en nevera hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de decolorante.

4. SOLUCIÓN DE LAVADO HYDRASYS
Preparación
Cada vial de la Solución de Lavado HYDRASYS concentrada (SEBIA, referencia nº 4541: 10 viales de 80 mL cada uno) debe completarse hasta 5 L con agua destilada o desionizada. Después de la dilución, la solución de lavado contiene: tampón alcalino 8.8 ± 0.3 ; azida sódica.

ATENCIÓN: La solución de lavado concentrada contiene un 0.625 % de azida sódica. ¡No la ingiera! ¡En caso de ingestión, consulte a un médico inmediatamente! La azida sódica puede formar compuestos explosivos o tóxicos si contacta con ácidos, plomo o cobre. Lave siempre con una gran cantidad de agua cuando deseche el producto.

Uso
Para el lavado periódico de la cubeta de coloración del HYDRASYS: por ejemplo, si se usa a diario hay que limpiar la cubeta una vez por semana.
Consulte la hoja de instrucciones de la solución de lavado para conocer las directrices de uso.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro
Las soluciones de lavado concentrada y diluida pueden conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados. Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de solución de lavado.
Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Extracción y conservación de las muestras
El análisis se realiza con suero y LCR obtenidos a la vez, de acuerdo con los procedimientos establecidos de uso en el laboratorio clínico. Se recomienda realizar los análisis con sueros y LCR frescos. Las muestras pueden conservarse hasta una semana en nevera (2 a 8 °C). Para conservaciones más prolongadas, congele las muestras. El suero y LCR congelados son estables durante un mes por lo menos.

Preparación de las muestras
- Mida las concentraciones de Ig G en el suero y el LCR usando procedimientos apropiados.
- La concentración de Ig G en cada pareja LCR/suero que se va a comparar debe estar ajustada al mismo nivel en ambas muestras.

El ajuste depende de la concentración inicial de inmunoglobulinas (Ig G) del LCR; use el Diluyente de Muestra para todas las diluciones:

1er caso: la concentración de Ig G del LCR es superior a 20 mg/L.
Diluya el LCR y el suero con diluyente de muestra para obtener una concentración de Ig G de 20 mg/L.

2º caso: la concentración de Ig G del LCR está comprendida entre 10 y 20 mg/L.
Use LCR sin diluir y diluya el suero con el diluyente de muestra para obtener una concentración de Ig G idéntica a la del LCR.

3er caso: La concentración de Ig G del LCR es inferior a 10 mg/L.
Concentre el LCR con un dispositivo apropiado para obtener una concentración de Ig G comprendida entre 10 y 20 mg/L. Diluya el suero con diluyente de muestra para obtener una concentración de Ig G idéntica a la del LCR.

Ejemplo de diluciones (sólo para muestras con una concentración de Ig G superior a 20 mg/L):

Para el LCR:
A = concentración de Ig G en mg/L.
Obtenga 20 µL de LCR y mézclelos con (A - 20) µL de diluyente de muestras.

Para el suero:
B = concentración de Ig G en mg/L.
Diluya el suero 10 veces con diluyente de muestras, por ejemplo, 10 µL de suero y 90 µL de diluyente de muestras.
Obtenga 2 µL de suero prediluido a 1:10 y añada (B/100 – 2) µL de diluyente de muestras.

Cuando no se conoce la concentración de Ig G:

Use LCR neto y diluya el suero entre 300 y 400 veces.

NOTA: Errores en el ajuste de las concentraciones de Ig G de las muestras de LCR y suero puede afectar a la interpretación de los resultados – consulte el párrafo "INTERPRETACIÓN."

PROCEDIMIENTO

El sistema HYDRASYS es un instrumento multiparamétrico semiautomático en el que los geles HYDRAGEL son tratados según las etapas siguientes: premigración, aplicación de las muestras, migración electroforética por isoelectroenfoque, incubación con el antisuero marcado, revelado, absorción y secado final.
Las etapas manuales son las siguientes: preparación de las muestras y los geles, aplicación de los reactivos y el inicio de las etapas automáticas.
LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL HYDRASYS.

IMPORTANTE: Ajuste previamente la posición de la plantilla para obtener una correspondencia perfecta entre los perfiles electroforéticos del gel y las pistas de revelado de la plantilla.

I. PREPARACIÓN DE LA MIGRACIÓN

1. Encienda el HYDRASYS.
2. Seleccione el modo "Alta tensión 1000 V", necesario para el isoelectroenfoque, pulsando el botón verde que está encima de la tapa del módulo de migración, que pasa a ser de color rojo.

   NOTA: La pantalla de este botón proporciona informaciones durante la migración. Si se presiona sucesivamente durante la migración, el botón indica o bien los valores de voltios hora acumulados (Vh) y la intensidad de la corriente (mA), o bien los valores de voltaje (V) y potencia (W).

   Cuando el HYDRASYS está en el modo de alta tensión, su pantalla indica las intensidades de corriente reales, aunque el resto de valores (voltaje, voltios hora y potencia) están divididos por 10.
3. Coloque un aplicador de 6 pocillos para el HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING o un aplicador de 18 pocillos para el HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING, en una superficie plana, con los números de los pocillos hacia arriba.
4. Aplique 10 µL de muestra en cada pocillo del aplicador (Fig. 1). Cargue el aplicador en menos de 2 minutos.
   El ejemplo siguiente presenta el análisis de 3 parejas LCR/suero con el HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING, y de 9 parejas LCR/suero con el HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING, usando el antisuero anti-Ig G - PER.

PACIENTE Nº	HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING		HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING	
	LCR	SUERO	LCR	SUERO
	POCILLO Nº (aplicador 6 pocillos)		POCILLO Nº (aplicador 18 pocillos)	
1	1	2	1	2
2	3	4	3	4
3	5	6	5	6
4	-	-	7	8
5	-	-	9	10
6	-	-	11	12
7	-	-	13	14
8	-	-	15	16
9	-	-	17	18

   - A continuación, coloque inmediatamente el aplicador ya cargado en posición vertical en la cámara húmeda, con los dientes hacia arriba, manipulándolo por la protección de plástico.

   Consulte la hoja de instrucciones de la cámara húmeda para conocer las directrices de uso.

   Antes de efectuar la aplicación de las muestras en el gel, debe realizarse una etapa de premigración hasta que se hayan acumulado 75 Vh, según las indicaciones siguientes:
5. Abra la tapa del módulo de migración y saque los soportes de los electrodos y el aplicador.
   ATENCIÓN: ¡No cierre la tapa del módulo de migración si los soportes están elevados!

6. Seleccione el programa de migración "3/9 CSF FOCUSING" en el menú del instrumento.
7. Saque las esponjas anódica y catódica ya impregnadas con las soluciones correspondientes (vea el párrafo nº 4 del capítulo REACTIVOS SUMINISTRADOS) de sus bandejas, cogiéndolas por las lengüetas de plástico.
8. Coloque las esponjas en el soporte de los electrodos, enganchando los extremos perforados de las lengüetas de plástico en las clavijas (Fig. 2) :
   - Cuando los soportes de los electrodos y el aplicador están elevados, la esponja anódica roja se coloca en el electrodo inferior (ánodo), y la esponja catódica incolora se coloca en el electrodo superior (cátodo).
   - El lado de la esponja fijado a la lengüeta contacta con el electrodo.
9. Saque el gel de su estuche.
10. **Seque el respaldo del gel (el lado del soporte de plástico) con un pañuelo de papel.**
11. Elimine el exceso de líquido de la superficie del gel con un papel de filtro fino, **durante 3 segundos.**
12. Dispense 150 µL de solución de etilén-glicol para el HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING ó 300 µL para el HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING, formando una línea, en el tercio inferior del marco serigrafiado en la placa del módulo de migración.
13. Ponga el gel (con el lado de agarosa hacia arriba) en la placa en el interior del marco serigrafiado, apoyando su parte inferior en la barrita de plástico situada en la base del marco serigrafiado (Fig. 3).
    Doble el gel (Fig. 3) y haga que contacte con la solución de etilén-glicol, que debe repartirse por debajo de todo el gel. Levante un poco el gel para eliminar las burbujas de aire que hayan podido quedar atrapadas, y después deposite el gel en la placa. La solución de etilén-glicol debe estar extendida bajo toda la superficie del gel.
14. Coloque una lámina de plástico sobre el gel:
    - Coja una lámina de plástico.
    - Alinee la parte inferior de la lámina de plástico con las dos marcas laterales situadas a 1,5 cm del borde catódico, impresas en el soporte plástico del gel (en la parte inferior del gel) (Fig. 4).
    - Coloque la lámina de plástico sobre el gel extendiéndola y evitando atrapar burbujas de aire entre el gel y la lámina de plástico.
    - Elimine las burbujas de aire que hayan podido quedar atrapadas elevando la lámina de plástico por la extremidad más cercana a las burbujas hasta que hayan desaparecido, volviendo a extender la lámina lentamente a continuación.
    - Evite desplazar el gel sobre la placa de migración durante esta operación.

    ATENCIÓN: La lámina de plástico no debe colocarse debajo de las 2 marcas laterales impresas en el soporte plástico del gel.
15. Baje ambos soportes. En esta posición, las esponjas tamponadas no tocan el gel. NO FUERCE LOS SOPORTES HACIA ABAJO.
16. Cierre la tapa del módulo de migración.
17. Inicie el procedimiento inmediatamente apretando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado).
    IMPORTANTE: Compruebe que la rejilla de ventilación del lado derecho del instrumento no está bloqueada).

PREMIGRACIÓN – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- El soporte de los electrodos desciende para que las esponjas tamponadas contacten con el gel.
- Migración a 1000 V como máximo, a 20 °C controlados por efecto Peltier, hasta que se hayan acumulado 75 Vh.
- El soporte de los electrodos se eleva para desconectarlos.
- Suena un pitido y la tapa se desbloquea. Esta señal sonora se mantendrá hasta que el operario abra la tapa. En pantalla aparece el mensaje intermitente: "POS : 1".

NOTA: La tapa del módulo de migración permanece cerrada durante todas las etapas de la migración.

18. Abra la tapa del módulo de migración.
19. Saque el aplicador de la cámara húmeda cogiéndolo por la protección de plástico.
    - Quite la protección de plástico de los dientes.
    - Coloque el aplicador en la posición nº 1 del soporte del aplicador.

    IMPORTANTE: Los números de los pocillos del aplicador deben quedar de cara al operario (Fig. 5).
20. Cierre la tapa del módulo de migración.
21. Inicie inmediatamente el procedimiento pulsando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado).

MIGRACIÓN – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Los soportes de los electrodos y el aplicador descienden para que las esponjas tamponadas y el aplicador contacten con el gel.
- El soporte del aplicador se eleva.
- Migración a 1000 V como máximo, a 20 °C controlados por efecto Peltier, hasta que se hayan acumulado 700 Vh (durante unos 45 minutos).
- El soporte de los electrodos se eleva para desconectarlos.
- Suena un pitido y la tapa se desbloquea. Esta señal sonora se mantendrá hasta que el operario abra la tapa. En pantalla aparece el mensaje intermitente: "⇩ AS", que indica que hay que aplicar el antisuero marcado.

NOTA: La tapa del módulo de migración permanece cerrada durante todas las etapas de la migración.

II. PREPARACIÓN DE LA INMUNOFIJACIÓN

Los diferentes elementos de la plantilla dinámica (segmento para antisueros, soporte del segmento y guía equipada con semireductor de superficie) aparecen en la figura 6.

Durante la migración, prepare la plantilla dinámica de la siguiente manera:

1. Ponga la guía de la plantilla dinámica equipada con el semireductor de superficie, específica para la técnica HYDRAGEL CSF ISOFOCUSING, en una superficie plana.
2. Ponga un segmento para antisueros en el soporte del segmento (Figura 7):
   - Coloque el segmento para antisueros, inclinado 45º, contra los resortes del soporte del segmento.
   - Apoyándose en esos resortes, estire el segmento hacia fuera y fíjelo en las muescas del soporte del segmento.

   ATENCIÓN: Compruebe que el segmento esté bien colocado en el soporte: los salientes situados en los extremos del segmento deben estar bien encajados en las muescas del soporte.

3. Ponga el conjunto segmento – soporte del segmento en la guía de la plantilla dinámica (Fig. 8), equipada con el semireductor de superficie. Aplique el antisuero como sigue:
   Para el HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING : aplique 20 µL de antisuero anti-Ig G-PER por pocillo, en los pocillos 4 a 12.
   Para el HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING : aplique 20 µL de antisuero anti-Ig G-PER en todos los pocillos.
   Pipetee el antisuero diluido sin que se formen burbujas de aire en la punta de la pipeta.
4. Para aplicar el reactivo (Figura 9):
   - sostenga la pipeta inclinada,
   - apoyando ligeramente la punta de la pipeta en el borde del orificio, dispense la gota de reactivo en los pocillos.

III. INMUNOFIJACIÓN

1. Abra la tapa del módulo de migración (el mensaje de la pantalla deja de ser intermitente).
2. Saque el aplicador de muestras y deséchelo.
3. Eleve ambos soportes, saque las esponjas tamponadas cogiéndolas por las lengüetas y tírelas.
4. Saque los soportes de los electrodos y el aplicador.
5. Limpie los electrodos con un pañuelo de papel humedecido.
6. Deje el gel en su lugar en el módulo de migración.
7. Antes de aplicar el antisuero anti-Ig G-PER con la plantilla dinámica, saque la lámina de plástico cogiéndola por un extremo y tírela.
   ATENCIÓN: No desplace el gel sobre la placa durante esta operación.
8. Coloque la plantilla dinámica en el módulo de migración y reparta el antisuero procediendo como sigue (Figura 10):
9. Coloque la barra metálica que se usa para fijar la plantilla con ayuda de los pernos de anclaje (una vez colocada, la barra metálica puede permanecer en el módulo de migración).
10. Coloque las muescas de la plantilla en las marcas de la barra cogiendo la plantilla por la lengüeta.
11. Haga descender la plantilla dinámica sobre la placa del HYDRASYS.
    IMPORTANTE: Ajuste previamente la posición de la plantilla dinámica para obtener una correspondencia perfecta entre los perfiles electroforéticos del gel y los pocillos de la plantilla.
12. Ponga el soporte del segmento en el punto más bajo de la guía de la plantilla, dirigido hacia el operario. Sostenga el conjunto soporte-segmento por el asa situada a la derecha y presione en el punto de apoyo central, de forma que el segmento para antisueros contacte con el gel. Deje de presionar, y entonces el antisuero se extenderá por debajo de todo el segmento (Figura 11).
13. Inmediatamente, con ayuda del asa situada a la derecha, reparta el antisuero realizando dos veces un movimiento lento y regular de ida y vuelta de la plantilla dinámica por encima del gel (cada ida y vuelta debe durar unos 8 segundos), evitando la pérdida de contacto entre el segmento y el gel (Figura 12).
    - Durante esta operación, coja la plantilla sólo por el asa, sin tocar la guía.
    - Deje la plantilla dinámica sobre el gel en posición baja.
14. Cierre la tapa del módulo de migración.
15. Inicie inmediatamente la incubación presionando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado). En pantalla aparece el mensaje "[INCUBACION]".

INMUNOFIJACIÓN – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Incubación a 20 °C controlados por efecto Peltier, durante 10 minutos.
- Suena un pitido y la tapa del módulo de migración se desbloquea. En pantalla aparece el mensaje "⇩ PAP.".

NOTA: La tapa del módulo de migración permanece bloqueada durante la incubación.

IV. ABSORCIÓN CON PAPEL

1. Abra la tapa del módulo de migración.
2. Saque la guía y la plantilla dinámica.
   - coja la guía por el asa.
   - levante la guía y sáquela.
   - saque el segmento del soporte y tírelo.

   ATENCIÓN: Manipule con precaución el segmento que haya contenido antisuero.
3. Aplique un papel de filtro grueso sobre el gel:
   - incline el papel de filtro grueso unos 45º y alinee el borde inferior del papel de filtro con el borde inferior del gel.
   - coloque el papel encima del gel.

   ATENCIÓN: Presione sobre toda la superficie del papel de filtro para asegurar un contacto perfecto entre el gel y el papel.
4. Cierre la tapa del módulo de migración.
5. Inicie el procedimiento apretando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado).

ABSORCIÓN CON PAPEL – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Absorción a 20 °C, controlados por efecto Peltier, durante 3 minutos.
  En la pantalla aparece el mensaje "[ABSORCION]".
- Suena un pitido.
  En la pantalla aparece el mensaje intermitente "⇧ PAP. + ⇩ REHID 1", que indica que hay que sacar el papel de filtro y aplicar la solución rehidratante.

V. REHIDRATACIÓN DEL GEL

1. Abra la tapa del módulo de migración.
2. Saque el papel de filtro, dejando el gel en su sitio.
3. Coloque encima del gel la plantilla R3 para el HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING o la plantilla ENZ 4 mL para el HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING (Figura 13).
4. Dispense 4,5 mL de solución rehidratante para el HYDRAGEL 3 CSF FOCUSING ó 7 mL para el HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING a través del agujero de la plantilla, en el espacio que hay por debajo (Figura 14).
   El líquido recubre la totalidad de la superficie que está por debajo de la plantilla.

5. No atrape burbujas de aire en la punta de la pipeta al aspirar la solución rehidratante. Para dispensar la solución rehidratante:
   - sostenga la pipeta verticalmente.
   - dispense la solución rehidratante con cuidado y progresivamente sin introducir burbujas de aire por debajo de la plantilla.
6. Cierre la tapa del módulo de migración.
7. Inicie el procedimiento inmediatamente apretando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado), y el mensaje dejará de ser intermitente.

REHIDRATACIÓN DEL GEL – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Incubación a 20 °C controlados por efecto Peltier, durante 5 minutos.
- Suena un pitido. En la pantalla aparece el siguiente mensaje intermitente: "⇧ REHYD 1 + ⇩ PAP.", que indica que hay que eliminar la solución rehidratante y aplicar un papel de filtro grueso.

VI. ELIMINACIÓN DE LA SOLUCIÓN REHIDRATANTE

1. Abra la tapa del módulo de migración.
2. Elimine la solución rehidratante:
   - sostenga la pipeta en posición vertical y apoye ligeramente la punta de la pipeta en el pocillo (Figura 14);
   - aspire el reactivo con cuidado y progresivamente.
3. Saque la plantilla de aplicación de reactivos:
   - coja la plantilla por la solapa ;
   - eleve la plantilla y sáquela ;
   - la zona del gel recubierta por el líquido está rehidratada.

VII. ABSORCIÓN CON PAPEL

1. Aplique un papel de filtro grueso sobre el gel, tal como se ha descrito en el párrafo IV.
2. Presione sobre toda la superficie del papel de filtro grueso para que se adhiera bien al gel.
3. Cierre la tapa del módulo de migración.
4. Inicie el procedimiento apretando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado); el mensaje de la pantalla dejará de ser intermitente.

ABSORCIÓN CON PAPEL – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Absorción a 20 °C controlados por efecto Peltier, durante 3 minutos.
- Suena un pitido. En la pantalla aparece el siguiente mensaje intermitente: "⇧ PAP. + ⇩ REHID 2", que indica que hay que sacar el papel de filtro grueso y aplicar solución rehidratante.

VIII. REHIDRATACIÓN DEL GEL

1. Abra la tapa del módulo de migración.
2. Saque el papel de filtro, dejando el gel en su sitio.
3. Coloque encima del gel la plantilla R3 para el HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING o la plantilla ENZ 4 mL para el HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING (Figura 13).
4. Dispense 4,5 mL de solución rehidratante para el HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING ó 7 mL para el HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING a través del agujero de la plantilla, en el espacio que hay por debajo (Figura 14). El líquido recubre la totalidad de la superficie que está por debajo de la plantilla.
5. No atrape burbujas de aire en la punta de la pipeta al aspirar la solución rehidratante. Para dispensar la solución rehidratante proceda tal como se ha explicado en el párrafo V.
6. Cierre la tapa del módulo de migración.
7. Inicie el procedimiento inmediatamente apretando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado); el mensaje de la pantalla dejará de ser intermitente.

REHIDRATACIÓN DEL GEL – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Incubación a 20 °C controlados por efecto Peltier, durante 5 minutos.
- Suena un pitido. En la pantalla aparece el siguiente mensaje intermitente: "⇧ REHID 2 + ⇩ TTF3", que indica que hay que eliminar la solución rehidratante y aplicar la solución de visualización.

IX. ELIMINACIÓN DE LA SOLUCIÓN REHIDRATANTE

1. Abra la tapa del módulo de migración.
2. Elimine la solución rehidratante tal como se ha descrito en el párrafo VI.
3. No saque la plantilla.

X. REVELADO

1. Aplique 3 mL de la solución de revelado TTF3 recién preparada para el HYDRAGEL 3 CSF ISOFOCUSING ó 3.5 mL para el HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING, en el espacio que hay por debajo de la plantilla. La solución de revelado recubre toda la superficie que hay por debajo de la plantilla.
2. No atrape burbujas de aire en la punta de la pipeta al aspirar la solución de revelado. Para dispensar la solución de revelado, proceda tal como se ha descrito en el párrafo V.
3. Cierre la tapa del módulo de migración.
4. Inicie el procedimiento inmediatamente apretando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado).

REVELADO – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Incubación a 30 °C controlados por efecto Peltier, durante 15 minutos.
- Suena un pitido. En la pantalla aparece el siguiente mensaje intermitente: "⇧ TTF3 + ⇩ PAP.", que indica que hay que eliminar la solución de revelado y aplicar un papel de filtro grueso.

XI. ELIMINACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE REVELADO

1. Abra la tapa del módulo de migración.
2. Elimine la solución de revelado tal como se ha descrito en el párrafo VI.
3. Saque la plantilla:
   - coja la plantilla de aplicación de reactivos por la solapa ;
   - eleve la plantilla y sáquela.

XII. ABSORCIÓN CON PAPEL

1. Aplique un papel de filtro grueso sobre el gel, procediendo tal como se ha descrito en el párrafo IV.
2. Presione sobre toda la superficie del papel de filtro para que se adhiera bien al gel.
3. Cierre la tapa del módulo de migración.
4. Inicie el procedimiento apretando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado).
5. Lave la plantilla de aplicación de reactivos con agua corriente con un cepillo flexible (tipo cepillo de dientes). La plantilla debe estar completamente seca antes de usarla de nuevo. Para eliminar las gotas de agua que hayan podido quedar atrapadas, golpee suavemente la plantilla contra un pañuelo de papel y séquela.

   NOTA: Después de la etapa de revelado con el TTF3, se puede limpiar el lado funcional de las plantillas R3 y ENZ 4 mL usando un pañuelo de papel impregnado con alcohol.

ABSORCIÓN CON PAPEL – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Absorción a 30 °C controlados por efecto Peltier, durante 3 minutos.
- Suena un pitido. En la pantalla aparece el siguiente mensaje intermitente: "⇧ PAP.", que indica que hay que sacar el papel de filtro grueso.

XIII. SECADO DEL GEL

1. Abra la tapa del módulo de migración.
2. Saque el papel de filtro grueso y deje el gel en el módulo de migración.
3. Cierre la tapa del módulo de migración.
4. Inicie el secado apretando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado). En la pantalla aparece el mensaje: "[SECADO]".

SECADO – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Secado del gel a 50 °C controlados por efecto Peltier, durante 3 minutos.
- Suena un pitido que indica que hay que abrir la tapa.
- Abra la tapa.
- Saque el gel seco.

NOTAS:

- *Después de abrir la tapa, la temperatura de la placa desciende hasta 20 ºC (en menos de 5 minutos). Puede entonces comenzarse una nueva migración.*
- *Vuelva a colocar en el módulo de migración el soporte de los electrodos y el aplicador.*
- *Limpie la placa con un pañuelo de papel humedecido.*

XIV. LAVADO DEL GEL

1. Coloque el gel en el soporte del gel, con la cara de agarosa hacia el operario, procediendo de la manera siguiente (Figura 15):
   - abra el soporte del gel:
   - póngalo en una superficie plana ;
   - coloque el gel en las ranuras de las varillas ;
   - cierre el soporte del gel ;
   - compruebe que el gel esté bien colocado en las ranuras.
2. Introduzca el soporte del gel en el módulo de tratamiento / coloración del gel.

   IMPORTANTE: Compruebe lo siguiente antes de comenzar el lavado:
   - el contenedor de solución decolorante contiene al menos 400 mL de solución decolorante.
   - el contenedor de desechos está vacío.
3. Para saber en qué posición conectar los reactivos debe consultar la información que aparece en la pantalla del aparato después de pulsar la tecla : VER CANALES.

   IMPORTANTE: No olvide bloquear los canales no usados.
4. Seleccione el programa de lavado “LAV. ISOENZ/GEL” en el menú del instrumento e inicie el procedimiento apretando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado derecho del teclado).

   El sistema permanece bloqueado durante todas las etapas de lavado y secado.

   Después de que se haya enfriado la cubeta, suena un pitido y el módulo se desbloquea (la ventilación se mantiene hasta que se extrae el soporte del gel).
5. Saque el soporte del gel del compartimento; abra el soporte del gel y extraiga el gel seco. Si es necesario, limpie y seque el respaldo del gel (el lado de soporte de plástico) con un pañuelo de papel humedecido. El gel está listo para ser interpretado.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda incluir un suero control en cada serie de análisis (Control CSF, SEBIA, referencia nº 4794).

INTERPRETACIÓN

El principio de interpretación es sencillo: hay que comparar el perfil de las inmunoglobulinas de las parejas LCR/suero correspondientes.
La síntesis intratecal en el sistema nervioso central (SNC) se detecta por la presencia de bandas de Ig G en el perfil electroforético del LCR que no están presentes en el suero del mismo paciente. El suero siempre presenta bandas que pueden ser más o menos visibles, y en posiciones diferentes o idénticas a las observadas en el LCR (Figura 16).

En teoría una única banda suplementaria en el LCR, ausente en la misma posición en el suero correspondiente, permite sospechar la existencia de síntesis intratecal. En la práctica, dos o más bandas suplementarias en el LCR son interpretadas como una indicación suficiente a favor del diagnóstico de esclerosis múltiple. Estas recomendaciones pueden evolucionar en función de los resultados obtenidos. Hay que tener en cuenta que el número de bandas observadas en un perfil oligoclonal no está correlacionado obligatoriamente con la gravedad o el pronóstico de la esclerosis múltiple. Por estos motivos, el número de bandas no debe ser tenido en cuenta, para evitar falsas interpretaciones.

Para poder hacer una interpretación comparativa correcta es indispensable:
- analizar líquidos biológicos del paciente (LCR y suero) obtenidos al mismo tiempo, en ausencia de cualquier tratamiento que pueda modificar la concentración de inmunoglobulinas,
- medir de forma precisa la concentración de Ig G del LCR y el suero para analizar cantidades idénticas en el gel.
- Si no se conoce la concentración de inmunoglobulinas, hay que diluir el suero entre 300 y 400 veces, y hay que analizar el LCR sin concentrar. En estos casos, la diferencia en la concentración de Ig G puede conducir a realizar interpretaciones falsas.

La detección de una síntesis intratecal de inmunoglobulinas mediante inmunofijación sensibilizada es más específica y sensible que la indicada por los diferentes cálculos de cocientes o de índices realizados a partir de las concentraciones de Ig G, de la albúmina y de otras proteínas del LCR y el suero.
La confirmación de una síntesis intratecal de inmunoglobulinas es una información importante para sospechar una patología inflamatoria del sistema nervioso central.

Un perfil oligoclonal o cualquier otra indicación de síntesis intratecal puede aparecer en diferentes patologías cerebrales, por ejemplo:
- 95 % de las esclerosis múltiples,
- 100 % de las neurosífilis no tratadas,
- 100 % de las leucoencefalitis subagudas esclerosantes.

En conclusión, se puede detectar síntesis intratecal en numerosas enfermedades del SNC, asociadas generalmente a una inflamación, como las infecciones, neuropatías periféricas, neoplasmas, accidentes vasculares cerebrales, etcétera.
El diagnóstico no debe en ningún caso basarse únicamente en los resultados de la inmunofijación. Estos resultados deben ser incluidos en un conjunto de informaciones clínicas e históricas del paciente, completadas con exámenes bioquímicos, microbiológicos y citológicos.

Interferencias y Limitaciones
El uso de antisueros distintos a los indicados por el fabricante para los procedimientos HYDRAGEL 3 y 9 CSF ISOFOCUSING puede afectar a los resultados.
Debido a los principios analíticos de las técnicas actuales, es posible que algunos componentes monoclonales no sean detectados por este método.

Resolución de problemas
Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de su distribuidor cuando la prueba no funcione pese a haber seguido cuidadosamente las instrucciones para la preparación y conservación de los materiales.
Puede solicitar las fichas de seguridad de los diferentes reactivos y las informaciones relativas a la eliminación de los productos de desecho al Servicio de Asistencia Técnica de su distribuidor.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Reproducibilidad intraserial (repetibilidad)
Las muestras de LCR y suero de cuatro pacientes han sido analizadas en 2 lotes diferentes de geles HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING, realizando 9 análisis de cada pareja LCR / suero en cada gel (2 parejas presentaban síntesis intratecal y 2 parejas no la presentaban).

Reproducibilidad intralote e interlotes
Ocho parejas LCR/suero han sido analizadas en 10 geles HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING de un mismo lote y en 2 geles de un lote diferente (6 parejas presentaban síntesis intratecal y 2 parejas no la presentaban).

Resultados:
Los resultados obtenidos en el HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING mediante análisis cualitativo indican una muy buena repetibilidad y reproducibilidad del kit HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING en todos los aspectos probados usando el antisuero marcado dirigido contra las inmunoglobulinas de tipo G.
Respecto a la repetibilidad y reproducibilidad, cada muestra analizada proporciona los mismos resultados en los 2 lotes de geles probados y los perfiles obtenidos son característicos de cada una de las muestras analizadas.

Exactitud – Detección e identificación de bandas oligoclonales
El análisis de 108 muestras diferentes de pacientes que presentan diferentes enfermedades del sistema nervioso central, mediante electroforesis en el gel HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING usando el antisuero anti-Ig G y otro sistema comercial de geles de agarosa, muestra una correlación perfecta entre los dos sistemas de análisis, con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 84,6 % respecto a la última técnica, calculadas según el método recomendado (Wending, 1986).

Sensibilidad
La sensibilidad de la técnica HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING es tal que el límite de detección de una paraproteína G, a la concentración inicial de 20 mg/L, es del orden de 0,31 mg/L.

BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAPHY

1. Ali S, Sun T, Narukar L. Oligoclonal banding in cerebrospinal fluids of Lyme disease patients. *Am J Clin Pathol*, 1993, 100 : 335.
2. Anderson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G *et al*. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis : a consensus report. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 1994, 57 : 897-902.
3. Blennow K, Fredman P, Wallin A, Gottfries CG, Frey H, Skoog I, Svennerholm L. Formulas for the quantitation of intrathecal Ig G production. Their validity in the presence of blood-brain barrier damage and their utility in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 1994, 121 : 90-96.
4. Caudie C, Vergne A, Saint-Marc T, Touraine F, Livrozer JM, Confraveux C, Quincy CL, Touraine JL. Profil biologique du LCR chez 48 patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). *Retrovirus*, 1990, 5 : 34-42.
5. Caudie C, Allauzen O, Bancel J, Later R. Apport de la focalisation isoélectrique des immunoglobulines G du liquide céphalorachidien dans le bilan biologique précoce de la sclérose en plaques. *Ann Biol Clin*, 2000, 58 : 187-193.
6. Christenson RH, Russell ME, Gubar KT, Silverman LM, Ebers GC. Oligoclonal banding in cerebrospinal fluid assessed by electrophoresis on agarose after centrifugal sample concentration through a microconcentrator membrane. *Clin Chem*, 1985 , 31 : 1734-1736.
7. Davenport RD, Keren DF. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluids : significance of corresponding bands in serum for diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Chem*, 1988 , 34 : 764-765.
8. Ford HC. Abnormalities of serum and plasma components in patients with multiple sclerosis. *Clin Chem*, 1985, 18 : 3-13.
9. Gerson B, Cohen SR, Gerson IM, Guest GH. Myelin basic protein, oligoclonal bands and Ig G in cerebrospinal fluid as indicators of multiple sclerosis. *Clin Chem*, 1981, 27 : 1974-1977.
10. Guessain A, Caudie C, Gout O *et al*. Intrathecal synthesis of antibodies to human T lymphotropic Virus Type I and the presence of Ig G oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with endemic tropical spastic paraparesis. *J Inf Dis*, 1988, 157, 6 : 1226-1234.
11. Souverijn JHM, Serrée HMP, Peet R, Grenzebach Smit W, Bruyn GW. Intrathecal immunoglobulin synthesis : Comparison of various formulae with the " gold standard " of isolelectric focusing. *J Neurol Sci*, 1991, 102 : 11-16.
12. Kabat EA, Landow H, Moore DH. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J Clin Invest*, 1942, 21 : 571-577.
13. Keren DF, "High Resolution Electrophoresis and Immunofixation Techniques and Interpretation", Butterworth-Heinemann, Woburn, MA, USA, 1994, 397 pp.
14. Keshgegian AA, Coblentz J, Lisak RP. Oligoclonal immunoglobulins in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Clin Chem*, 1980 , 26 : 1340-1345.
15. Mac Lean BN, Luxton RW, Thompson EJ. A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the Log Ig G-index. *Brain*, 1990, 113 : 1269-1289.
16. Olsson JE, Link H. Immunoglobulin abnormalities in multiple sclerosis. *Arch Neurol*, 1973, 28 : 392-399.
17. Onraed B, Faucompré JL, Vélia P, Guttierez J, Marchetti P, Hennache B. Diagnostic de la sclérose en plaques et intérêt de l'isoélectrofocalisation en gel d'agarose. *Immunoanal Biol Spec*, 1999, 14 : 251-255.
18. Papadopoulos NM, Costello R, Kay AD, Cutler NR, Rapoport SL. Combined immunochemical and electrophoretic determinations of proteins in paired serum and cerebrospinal fluid samples. *Clin Chem*, 1984 ; 30 : 1814-1816.
19. Reiber. Liquor diagnostik. *Diagnose and Labor*, 1987, 37 : 63-72.
20. Sharief MK, Thompson EJ. Intrathecal immunoglobulins M synthesis in multiple sclerosis. Relationship with clinical and cerebrospinal fluid parameters. *Brain*, 1991, 114 : 181-195.
21. Sindic CJM, Monteyne P, Laterre EC. The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 1994, 54 : 75-80.
22. Winfield JB, Shaw M, Silverman LM, Eisenberg RA, Wilson HA, Koffler D. Intrathecal Ig G synthesis and blood-brain barrier impairment in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system dysfunction. *Am J Med*, 1983, 74 : 837-844.
23. Wendling A. Procédures de diagnostic ou de dépistage : Justification et validité d'un test de diagnostic ou de dépistage-sensibilité-spécificité. *Impact-Internat*, 1986 ; Sept : 93-97.

SCHÉMAS / FIGURES

Figure 1

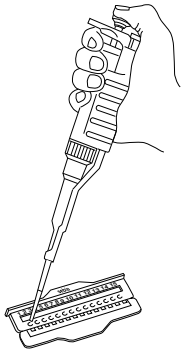


Figure 2

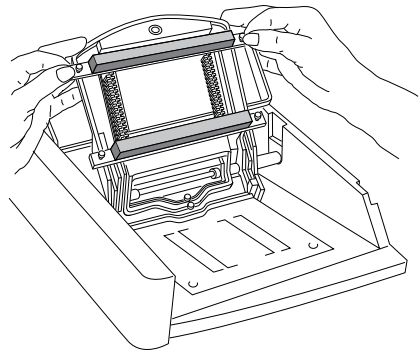


Figure 3

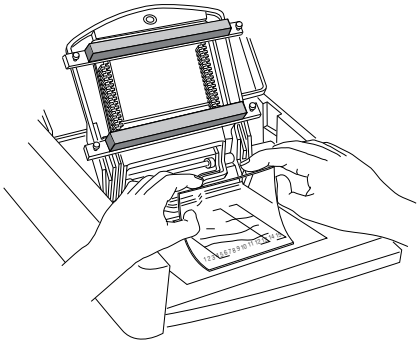


Figure 4

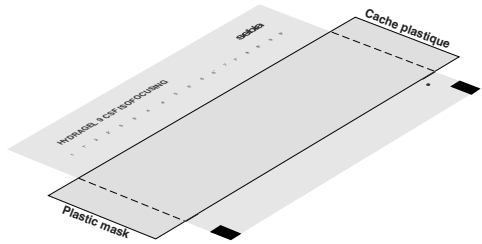
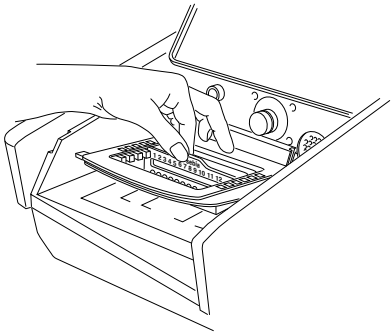


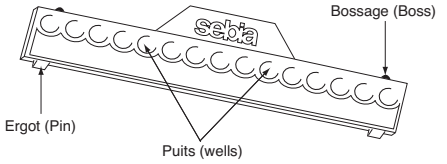
Figure 5



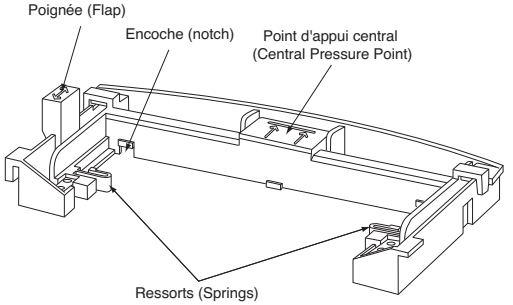
SCHÉMAS / FIGURES

Figure 6

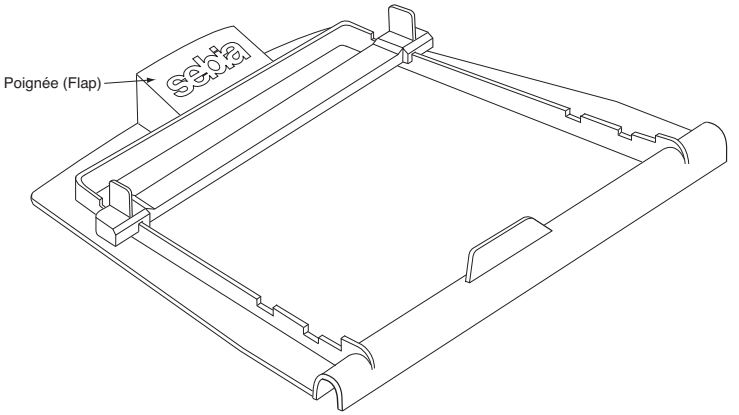
Barrette antisérum
Antiserum Segment



Support barrette
Segment Holder



Guide du masque dynamique + Demi réducteur de course
Dynamic Mask Guide + Length-half Reducing Device



SCHÉMAS / FIGURES

Figure 7

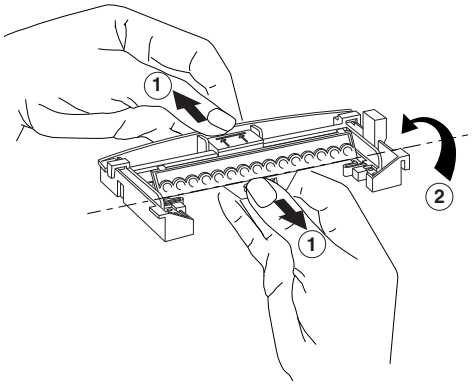


Figure 8

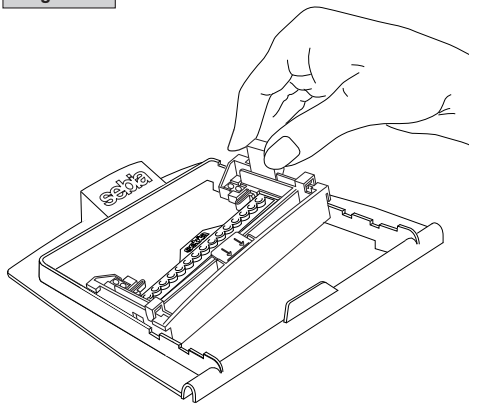


Figure 9

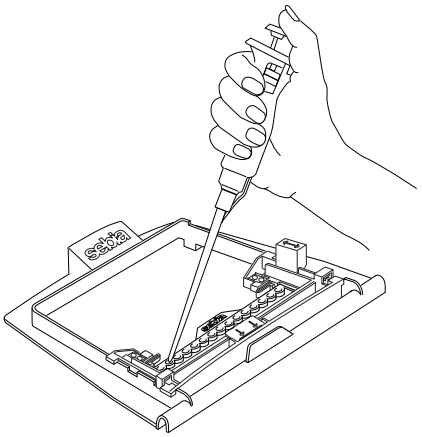


Figure 10

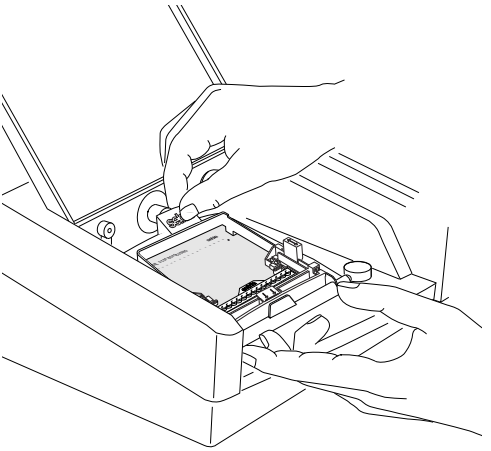


Figure 11

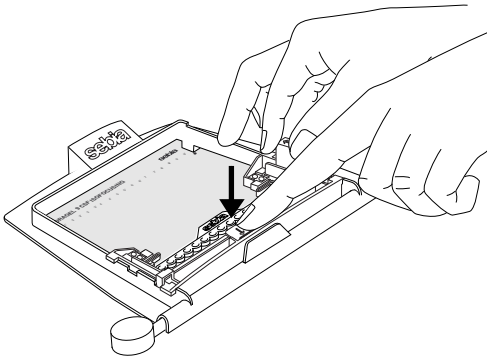
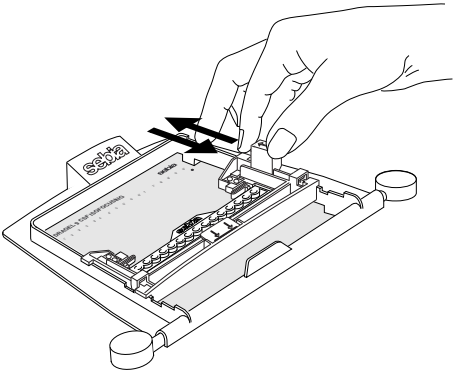


Figure 12



SCHÉMAS / FIGURES

Figure 13

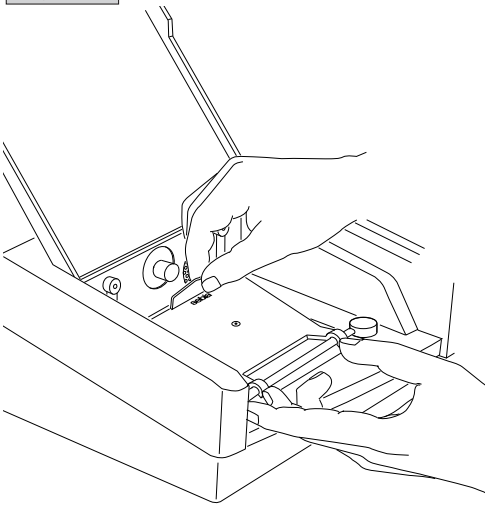


Figure 14

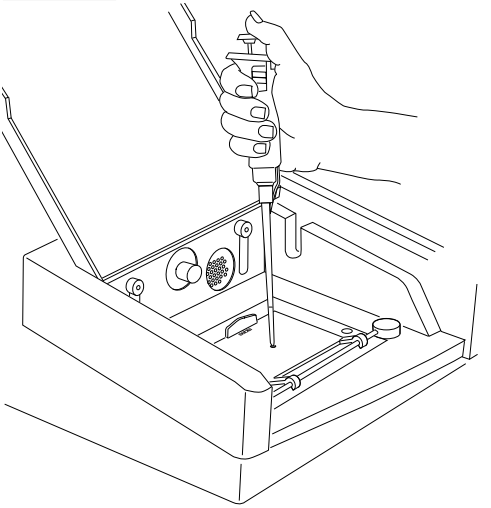
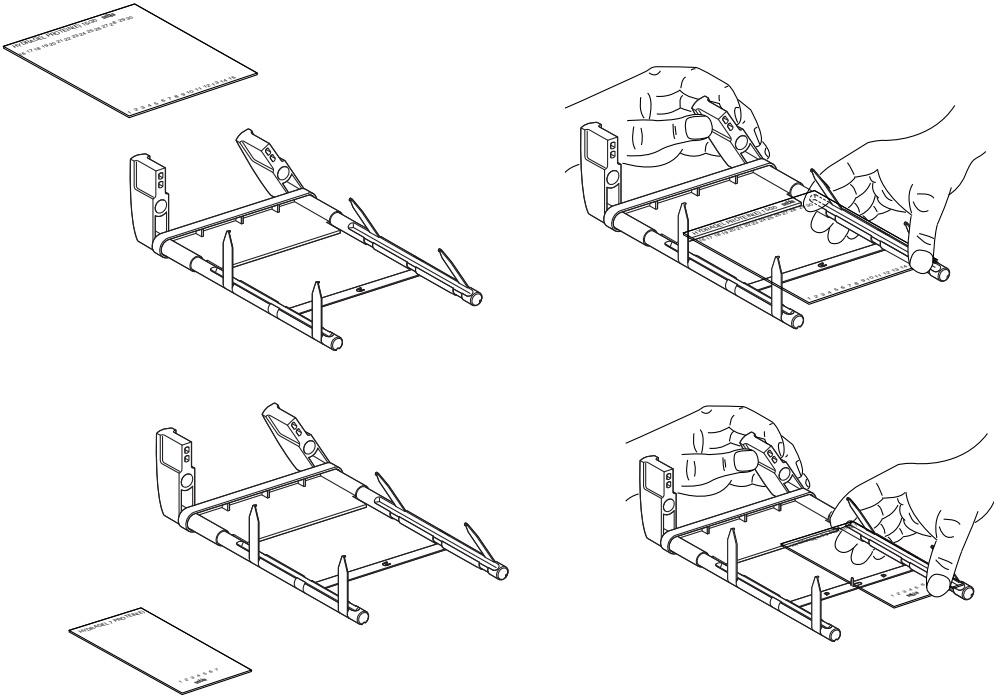
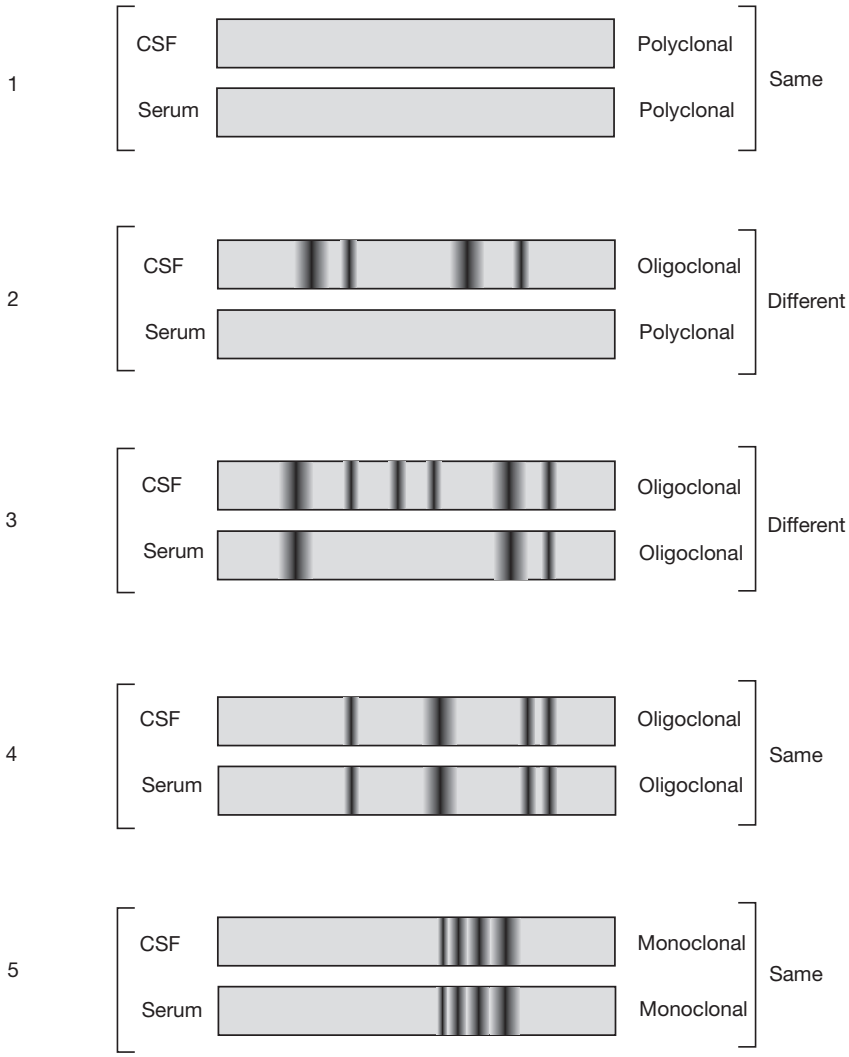


Figure 15



PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES / MIGRATION PATTERNS



Type 1 : Profil normal
Type 2 : Synthèse intrathécale d'Ig G (ex : Sclérose en Plaques)
Type 3 : Synthèse intrathécale d'Ig G dans les maladies systémiques
Type 4 : Inflammation systémique (profil en miroir avec bandes oligoclonales)
Type 5 : Gammapathie monoclonale (profil en miroir avec bandes monoclonales)

Type 1 : Normal pattern
Type 2 : Intrathecal Ig G synthesis (ex : Multiple Sclerosis)
Type 3 : Intrathecale Ig G synthesis in systemic disease
Type 4 : Systemic inflammation (mirror pattern with oligoclonal pattern)
Type 5 : Monoclonal gammopathy (mirror pattern with monoclonal bands)